

# Recherches sur les agents entomopathogènes d'origine virale

## chez les lépidoptères défoliateurs du palmier à huile et du cocotier <sup>(1)</sup>

R. DESMIER de CHENON (2), D. MARIAU (3), P. MONSARRAT (4), G. FÉDIÈRE (5) et A. SIPAYUNG (6)

**Résumé.** — Les premières déterminations des organismes entomopathogènes d'origine virale et les premiers essais en plantations sur *Limacodidae* ont été faits à l'instigation de l'IRHO dès 1975. Des petits virus libres *Densovirus*, *Picornavirus* ont été mis en évidence en Amérique du Sud et Afrique de l'Ouest, et d'autres de type  $\beta$  *Nudaurelia* dans le Sud-Est Asiatique. Des particules virales de taille plus grande, *Reovirus* (polyédrose cytoplasmique), *Baculovirus* (polyédrose nucléaire, granuleuse) ont été aussi observées. En Indonésie, une recherche de maladies virales a été effectuée et la symptomatologie de nouvelles maladies analysée : polyédrose cytoplasmique et maladie à petits virus sur *Setothosea asigna*, association de granulose et petits virus de type  $\beta$  *Nudaurelia* sur *Darna trima*, *Parasa lepida*. En plus de la caractérisation de ces pathogènes, des observations de l'incidence de ces maladies ainsi que les premiers tests expérimentaux ont été faits en plantation. Les premiers résultats d'utilisation en vraie grandeur montrent qu'une lutte microbiologique est possible. Des états de ces maladies virales, prospection, identité des virus, sélection des souches, potentialités d'utilisation, tests expérimentaux, tests de pathogénicité au laboratoire et en champ sont encore nécessaires sur hôtes secondaires ou cellules d'invertébrés avant de passer à des unités de production. Cette biotechnologie devrait fournir une alternative aux insecticides chimiques en réduisant les risques de provoquer des déséquilibres dans les biocénoses.

### INTRODUCTION

Les épizooties naturelles sur les chenilles défoliatrices des palmiers sont connues depuis longtemps. En 1925 De Jong au Nord-Sumatra en Indonésie signalait, lors d'une attaque de *Darna trima* Moore sur palmier à huile, la présence d'une maladie ayant éliminé naturellement la pullulation de cette espèce sur 300 hectares. Cette maladie, depuis, considérée comme d'origine virale, a été de nouveau mise en évidence en Malaisie au Sabah [Young, 1971].

Sur le cocotier, Tams en 1930 mentionne une maladie dite « bactérienne » sur *Darna catenatus* (Snellen) au Nord Sulawesi détruisant 80 p. 100 de la population des chenilles. Cette maladie sur cette espèce endémique des Célèbes a été retrouvée récemment et un petit virus isolé [Wikardi, 1984].

C'est depuis une dizaine d'années, grâce à la microscopie électronique et d'autres techniques de laboratoire, que les pathogènes impliqués dans ces maladies ont commencé à être caractérisés et que les possibilités d'utilisation de ces microorganismes comme méthode de lutte microbiologique ont été envisagées.

Les premières déterminations de virus sur les *Limacodidae* et les premiers essais en plantation ont été faits à l'instigation de l'IRHO en Amérique du Sud [Genty, Mariau, 1975].

Cette communication concerne particulièrement les résultats obtenus sur les *Limacodidae* en Indonésie.

### I. — HISTORIQUE DES PREMIÈRES CARACTÉRISATIONS ET BILAN ACTUEL

En 1964 C.Vago (INRA) découvre les densonucléoses dont les agents, les *Densovirus*, ont été mis aussi ensuite en évidence sur *Sibine fusca* Stöhl, *Limacodidae* du palmier à huile en Amérique du Sud [Meynadier *et al.*, 1977]. Récemment, un autre *Densovirus* a été trouvé sur *Casphalia extranea* Wlk., ravageur du palmier et du cocotier en Afrique de l'Ouest [Fédière *et al.*, 1981]. En 1977 des maladies virales ont été aussi déterminées dans le Sud-Est asiatique sur *Darna trima* Moore et *Setothosea asigna* van Eecke [Tiong *et al.*, 1977, 1979] avec présence du virus du type  $\beta$  *Nudaurelia* [Reinganum *et al.*, 1978].

Un autre virus de type *Picornavirus* a été détecté sur *Latoia viridissima* Holland en Côte d'Ivoire [Fédière *et al.*, 1981 ; Fédière, 1983]. D'autres virus de type *Baculovirus* (virus de polyédroses nucléaires et de granulosés), plus facilement identifiables par le corps d'inclusion qu'ils engendrent, ont été mentionnés sur quelques autres espèces, des *Limacodidae* pour la plupart, telles que *Darna nararia* Moore au Sri Lanka [Smith *et al.*, 1954], *Darna trima* Moore en Malaisie [Thomas *et al.*, 1973] ou encore *Natada pucara* Dognin en Colombie, Amérique du Sud [Genty *et al.*, 1978].

A partir de 1981 de très nombreuses maladies sur d'autres espèces ou des maladies différentes sur les espèces déjà indiquées ont été repérées dans les pays où l'IRHO exerce son activité et caractérisées par l'INRA et l'ORSTOM. Les résultats sont résumés dans le tableau I.

Plusieurs maladies sur d'autres espèces nous sont connues, entre autres sur *Hidari irava* (Moore) Hesperiidæ d'Indonésie, *Zophopetes cerymica* Hewitson autre espèce de la même famille en Côte d'Ivoire, *Natada michorta* Dyar il y a quelques mois au Brésil, etc.

(1) Communication présentée aux « 1987 International oil palm/palm oil Conferences, Progress and prospects », 23-26 juin 1987 à Kuala Lumpur (Malaisie).

(2) Consultant IRHO en Indonésie, c/o IRHO-CIRAD ; 11, Square Pétrarque, 75116 Paris (France).

(3) Directeur de la Division Entomologie, IRHO-CIRAD, B.P. 5035, 34032 Montpellier Cedex (France).

(4) ORSTOM, 213, rue Lafayette, 75480 Paris Cedex (France).

(5) ORSTOM, Centre d'Adiopodoumé, B.P. 51 Abidjan 01 (Côte d'Ivoire).

(6) P.P. Marhat, P.O. Box 37, Pematang Siantar, Nord-Sumatra (Indonésie).

TABLEAU I. — Les virus entomophages  
(Entomopathogenic viruses of oil)

| Famille<br>(Family) | Genre et espèces<br>(Genus and species) | P, C<br>(1)   | Type de virus<br>(Type of virus)  | Origine<br>(Origin)             | Références   |
|---------------------|---|---------------|---|---------------------------------|--|
| Hesperiidae         | <i>Pteroteinon laufella</i>             | P, C          | 1 virus de 30 nm et 1 virus de 40 nm<br>30-nm virus and 40 nm virus<br>non caractérisés - not classified  | Côte d'Ivoire                   | Kouenidjin, 1986   |
| Notodontidae        | <i>Turnaca rufisquamata</i>             | P             | <i>Picornavirus</i>   | Côte d'Ivoire                   | Fédière, 1985  |
| Lymantriidae        | <i>Dasychira mendosa</i>                | P, C          | <i>Baculovirus</i> de polyédrose nucléaire<br><i>Nuclear polyhedrosis</i> <i>Baculovirus</i>  | Indonesie                       | Martignoni & Iwai, 1981  |
|                     | <i>Orgyia turbata</i>                   | P<br>(fruits) | <i>Baculovirus</i> de polyédrose nucléaire<br><i>Nuclear polyhedrosis</i> <i>Baculovirus</i>  | Indonesie                       | Martignoni & Iwai, 1981  |
| Limacodidae         | <i>Casphalia extranea</i>               | P             | <i>Densovirus</i>   | Côte d'Ivoire                   | Fédière, 1981  |
|                     | <i>Darna nararia</i>                    | C             | <i>Baculovirus</i> de granulose<br><i>Granulosis</i> <i>Baculovirus</i>   | Sri Lanka                       | Smith & Xeros, 1954  |
|                     | <i>Darna trima</i>                      | P, C          | <i>Baculovirus</i> de granulose<br><i>Granulosis</i> <i>Baculovirus</i>   | W. Malaysia<br>(Selangor)       | Thomas & Poinar, 1973  |
|                     |   |               | <i>Baculovirus</i> de granulose et $\beta$ <i>Nudaurelia</i><br><i>Granulosis</i> <i>Baculovirus</i> and $\beta$ <i>Nudaurelia</i>  | E. Malaysia<br>(Sarawak, Sabah) | Reinganum, 1978  |
|                     |   |               | <i>Baculovirus</i> de granulose,<br>$\beta$ <i>Nudaurelia</i> et <i>Picornavirus</i><br><i>Granulosis</i> <i>Baculovirus</i> , $\beta$ <i>Nudaurelia</i><br>and <i>Picornavirus</i> | Indonesie<br>(South Sumatra)    | Monsarrat & Desmier<br>de Chenon, 1982<br>(Comm. pers. -<br>unpublished) |
|                     |   |               | <i>Baculovirus</i> de granulose et<br>$\beta$ <i>Nudaurelia</i><br><i>Granulosis</i> <i>Baculovirus</i> and<br>$\beta$ <i>Nudaurelia</i>  | Indonesie<br>(Kalimantan)       | Monsarrat & Desmier<br>de Chenon, 1986<br>(Comm. pers. -<br>unpublished) |
|                     | <i>Darna catenatus</i>                  | C             | Petit virus de taille indéterminée<br><i>Small virus of undetermined size</i>   | Indonesie<br>(Sulawesi)         | Wikardi, 1984  |
|                     | <i>Darna sordida</i>                    | P             | $\beta$ <i>Nudaurelia</i> et <i>Picornavirus</i><br>$\beta$ <i>Nudaurelia</i> and <i>Picornavirus</i>   | Indonesie (South<br>Sumatra)    | Monsarrat & Desmier<br>de Chenon, 1982 (non<br>publié - unpublished)     |
|                     | <i>Euprosteria elaeasa</i>              | P             | Polyédrose <i>Polyhedrosis</i>  | Colombia                        | Genty et al., 1978   |
|                     | <i>Latoia pallida</i>                   | C             | <i>Picornavirus</i>   | Côte d'Ivoire                   | Fédière, 1987 (Comm.<br>pers. - unpublished)                             |

(1) P : palmier à huile (*Oil palm*) - C : cocotier (*Coconut*).

## II. — MISE EN ÉVIDENCE DE MALADIES VIRALES SUR LES LIMACODIDAE EN INDONÉSIE

La plupart des chenilles fortement défoliatrices des palmiers et surtout du palmier à huile en Indonésie sont aussi des Limacodidae. Les dégâts sont provoqués par cinq espèces dominantes : *Setothosea asigna* van Eecke, *Birthissea bisura* Moore, *Darna trima* Moore, *Setora nitens* Walker et *Parasa lepida* Cramer sur cocotier.

### 1. — Maladies virales de *Setothosea asigna* van Eecke.

#### a) Symptomatologie des maladies.

##### Maladie « laiteuse ».

Une des caractéristiques des chenilles atteintes par cette maladie est de rejeter un liquide laiteux. La succession des symptômes est la suivante : il y a une modification du comportement, la chenille s'immobilise et ne s'alimente

plus. Les téguments deviennent plus ternes et prennent une teinte blanchâtre. Il y a parfois présence d'un exudat. Les téguments se déchirent libérant un liquide épais brunâtre avec des filets laiteux. Sur la feuille persistent de longues coulées de couleur blanc laiteux. A l'intérieur de la chenille, les organes sont complètement désorganisés avec un tube digestif hypertrophié blanchâtre.

##### Maladie « déliquescence ».

Les chenilles peuvent être aussi affectées par une autre série de symptômes complètement différents. On observe en général ces symptômes sur les stades jeunes. Les symptômes suivants sont ceux de la maladie sur une chenille de 6<sup>e</sup> stade infectée.

##### Symptômes externes :

Arrêt de prise de nourriture, immobilité. Jaunissement du corps à la partie ventrale et autour des taches dorsales, latéralement coloration brun rougeâtre avec côtés plus ou moins transparents laissant voir une totale déliquescence des tissus internes. Rupture facile de la peau de la chenille, un liquide jaunâtre s'en échappe.

des lépidoptères ravageurs des palmiers  
(palm and coconut caterpillars)

| Famille<br>(Family)    | Genre et espèces<br>(Genus and species) | P, C<br>(1) | Type de virus<br>(Type of virus)  | Origine<br>(Origin)                                   | Références   |
|------------------------|---|-------------|---|---|--|
| Limacodidae<br>(suite) | <i>Latoia viridissima</i>               | P, C        | <i>Picornavirus</i>   | Côte d'Ivoire   | Fédière, 1983  |
|                        | <i>Natada pucara</i>                    | P           | <i>Baculovirus</i> de polyédrose nucléaire<br><i>Nuclear polyhedrosis</i> <i>Baculovirus</i>  | Colombia  | Genty <i>et al.</i> , 1978   |
|                        | <i>Parasa lepida</i>                    | C           | <i>Baculovirus</i> de granuloze et $\beta$ <i>Nudaurelia</i><br><i>Granulosis</i> <i>Baculovirus</i> and $\beta$ <i>Nudaurelia</i>  | Indonesia<br>(South Sumatra)                          | Croizier & Desmier<br>de Chenon, 1985<br>(Comm. pers. -<br>unpublished)  |
|                        | <i>Setora nitens</i>                    | P, C        | $\beta$ <i>Nudaurelia</i>   | E. Malaysia<br>(Sabah)                                | Greenwood & Moore,<br>1982   |
|                        | <i>Setora tagalog</i>                   | C           | <i>Baculovirus</i> de polyédrose nucléaire<br><i>Nuclear polyhedrosis</i> <i>Baculovirus</i>  | Philippines (Luzon)                                   | Cock, 1985   |
|                        | <i>Sibine fusca</i>                     | P           | <i>Densovirus</i> ,<br><i>Picornavirus</i>  | Colombia<br>Colombia                                  | Meynadier <i>et al.</i> , 1977<br>Fédière, 1983  |
|                        | <i>Sibine nesea</i>                     | P           | <i>Densovirus</i> & <i>Picornavirus</i>   | Ecuador   | Croizier, 1986<br>(Comm. pers. -<br>unpublished)   |
|                        | <i>Setothosea asigna</i>                | P, C        | $\beta$ <i>Nudaurelia</i><br><br>Polyédrose cytoplasmique ( <i>Reovirus</i> )<br>et $\beta$ <i>Nudaurelia</i><br><i>Cytoplasmic polyhedrosis</i> ( <i>Reovirus</i> ) and<br>$\beta$ <i>Nudaurelia</i> | E. Malaysia<br>(Sarawak)<br>Indonesia<br>(N. Sumatra) | Reinganum <i>et al.</i> , 1978<br>Monsarrat, Croizier &<br>Desmier de Chenon,<br>1986 (Comm. pers.<br>- unpublished) |
|                        | <i>Birthisea bisura</i>                 | P, C        | $\beta$ <i>Nudaurelia</i>   | Indonesia<br>(S. Sumatra)                             | Monsarrat & Desmier<br>de Chenon, 1982<br>(Comm. pers. -<br>unpublished)   |
|                        | <i>Thosea boreocaerulea</i>             | C           | <i>Baculovirus</i> de polyédrose nucléaire<br><i>Nuclear polyhedrosis</i> <i>Baculovirus</i>  | Philippines (Luzon)                                   | Cock, 1985   |
|                        | <i>Thosea moluccana</i>                 | C           | Petit virus de taille indéterminée<br><i>Small virus of undetermined size</i>   | Indonesia   | Litt. 1982   |
| Psychidae              | <i>Mahasena corbetti</i>                | P           | 27 nm. virus non caractérisé<br><i>27 nm virus not classified</i>   | E. Malaysia<br>(Sarawak)                              | Spencer, 1976  |

*Symptômes internes :*

Ils ont été observés à la dissection de chenilles saines et malades de stade VI en début d'apparition de la maladie.

- Chenille malade : hémolymph jaunâtre, abondante. Système digestif vide. Pas de tissu adipeux abondant. Intestin déliquescent, odeur nauséabonde avec prolifération de bactéries si la maladie est avancée.

- Chenille saine : hémolymph limpide. Tube digestif brun sombre rempli de matière végétale. Masses importantes de tissus adipeux.

*b) Caractérisation des pathogènes.*

Il y a donc présence de deux types de symptômes et par conséquent de deux maladies chez les chenilles infectées de *Setothosea asigna*, ce que confirme l'analyse en microscopie électronique.

— *Chenilles atteintes de maladie « laiteuse ».*

Les chenilles de *S. asigna* en fin de développement, 7-9 stades avec des symptômes bien caractéristiques de la maladie laiteuse ont été traitées à l'INRA (Station de St-Christol-Lez-Alès).

La microscopie électronique montre la présence de corps d'inclusions de type polyèdres. Ces inclusions polyédriques après clarification révèlent à l'intérieur des particules virales sphériques de 60-70 nm enchâssées dans les alvéoles (Fig. 1). Il s'agit de *Reovirus* caractéristiques de réovirose ou polyédrose cytoplasmique. Ces inclusions polyédriques se développent dans les cellules de l'intestin moyen.

— *Chenilles atteintes de la maladie « déliquescente ».*

Les chenilles ont été analysées au Laboratoire d'Entomovirologie de l'ORSTOM en Côte d'Ivoire.

Des petites particules virales, icosaédriques, mesurant 35 nm de diamètre, de type  $\beta$  *Nudaurelia*, ont été mises en évidence (Fig. 2). Ce type de virus avait été déjà caractérisé par Reinganum *et al.* en 1978 (diamètre 35 nm, densité 1 275 g/cm<sup>3</sup>, une protéine de capsid de poids moléculaire de 60 800) à partir de chenilles malades de *S. asigna* obtenues par Tiong lors d'une pullulation de cette espèce au Sarawak en 1976-77.

*c) Observations en plantations.*

Les deux maladies virales de *S. asigna*, polyédrose cytoplasmique et virose de type  $\beta$  *Nudaurelia*, peuvent être



FIG. 1. — Maladie « laiteuse » de *Setothosea asigna* Moore : polyédrose cytoplasmique. Coupe de polyèdres avec alvéoles sphériques des particules virales (« Milky » disease of *Setothosea asigna* Moore : Cytoplasmic polyhedrosis. Cross-section of polyhedron with spherical depressions of viral particles) ( $\times 61.000$ ) Photo : INRA Saint Christol-les-Alès (France).

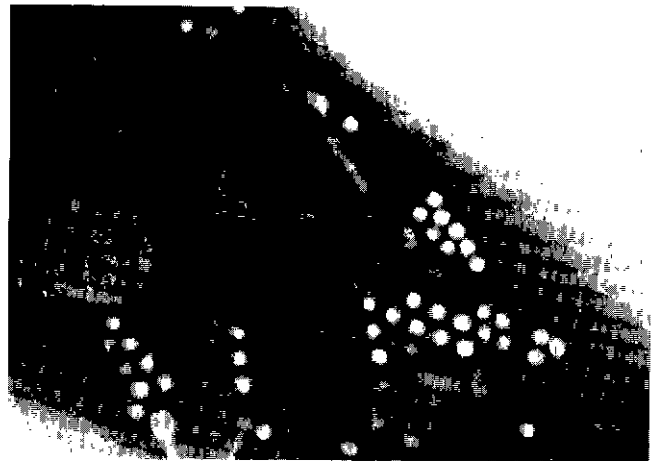


FIG. 2. — Maladie « déliquescente » de *Setothosea asigna* Moore : particules virales du type  $\beta$  *Nudaurelia* et celles d'un plus petit virus (« Deliquescent » disease of *Setothosea asigna* Moore :  $\beta$  *Nudaurelia* type viral particles and those of a smaller virus) ( $\times 113.000$ ). Photo ORSTOM (Côte d'Ivoire).

trouvées sur une même plantation séparément ou en mélange. En 1980-81 à Aek Loba (SOCFINDO), la polyédrose cytoplasmique, bien que peu fréquente, était en mélange avec des chenilles présentant des symptômes de la maladie de type  $\beta$  *Nudaurelia* sans que l'on puisse dire que les deux maladies fussent associées. Mais elle avait tendance à être dominante sur les populations âgées de *S. asigna* sur hybrides *E. guineensis*  $\times$  *E. oleifera* alors qu'elle était quasi inexistante sur *E. guineensis*.

Par contre, la même polyédrose cytoplasmique mise en évidence en 1985 au Nord-Sumatra à la station de Marihat n'était pas en mélange avec l'autre maladie.

Cette polyédrose cytoplasmique a été suffisante pour faire disparaître une population résiduelle de chenilles de *S. asigna* à Marihat, de même que sur hybrides à Aek Loba.

Sur les blocs à très forte pullulation, il ne semble pas que cette maladie ait naturellement une incidence très notable. L'autre maladie à petits virus semble par contre beaucoup plus virulente en particulier sur les jeunes stades. Des colonies entières, ou la population totale de palmes avec 150 à 200 chenilles, peut être détruite naturellement, les cadavres restant collés à la face inférieure des folioles. Mais sans tests expérimentaux cette action est difficile à apprécier.

#### d) Premiers tests expérimentaux.

##### — Polyédrose cytoplasmique.

A partir de jus bruts de chenilles atteintes de cette maladie, mais pouvant aussi héberger l'autre virus en faible quantité, des populations connues de *S. asigna* de stade 3-5 jours ont été traitées en jeunes cultures à l'aide de pulvérisateurs manuels à raison de 4 p. 100 de solution mère contenant 50 g de chenilles mortes dans 250 ml d'eau.

Après 8 jours dans trois répétitions traitées, 200 chenilles par lot, une mortalité de 84, 88 et 89 p. 100 a été obtenue alors que, dans le témoin, la mortalité ne dépasse pas 23 p. 100 ou au maximum 41 p. 100 (Fig. 3). Après 15 jours, la mortalité cumulée dans les objets traités atteint 95 à 100 p. 100.

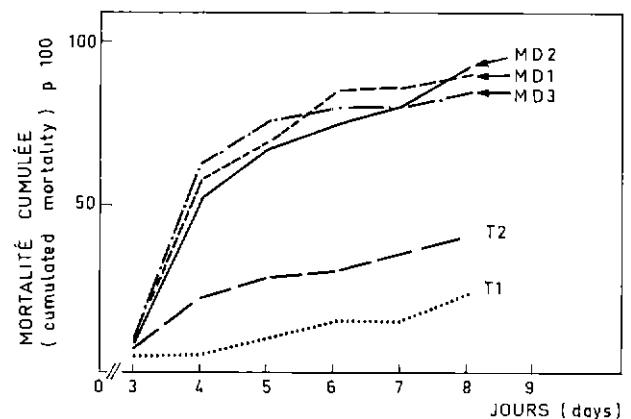


FIG. 3. — Traitement à l'aide d'une solution virale (polyédrose cytoplasmique) de *Setothosea asigna* Moore — stades 3 à 5 — (Treatments using a viral solution — cytoplasmic polyhedrosis — of *Setothosea asigna* Moore — 3rd to 5th instars).

T1 : Témoin (Control) 1 — T2 : Témoin (Control) 2

##### — Virose à $\beta$ *Nudaurelia*.

En 1980-81 des chenilles de *S. asigna* présentant des symptômes de cette maladie avaient été récupérées. Après broyage et léger filtrage la solution virale obtenue a été immédiatement utilisée pour traiter, à l'aide d'un atomiseur, 40 ha très infestés de jeunes cultures en début de production. Le résultat a été spectaculaire avec une élimination totale de la population de chenilles en une dizaine de jours. Mais à partir des chenilles mortes récoltées après ce traitement, les résultats n'ont pas été aussi satisfaisants. Il est vrai que la solution mère avait été gardée plusieurs mois dans de très mauvaises conditions de conservation.

Ces données sont à rapprocher de celles indiquées par Tiong en 1981 qui parle de résultats « erratiques » après utilisation d'une solution virale à base de chenilles malades de *S. asigna* dont l'agent pathogène était aussi le virus de type  $\beta$  *Nudaurelia*. Ce virus est efficace mais son pouvoir pathogène semble grandement influencé par les conditions de conservation.



La répartition de cette maladie à virus de type  $\beta$  *Nudaurelia* est, d'après nos connaissances, beaucoup plus grande que la polyédrose cytoplasmique. Les études en cours à Marihat devraient permettre, maintenant que les symptômes sont connus et les particules virales caractérisées, de tester le potentiel de ces pathogènes isolément ou en association à partir de matériel purifié.

## 2. — Maladies virales sur les chenilles de *Darna trima* Moore.

### a) Symptomatologie de la maladie.

Au cours des différentes phases de la maladie les symptômes externes sont assez semblables à ceux de la maladie « laiteuse » de *S. asigna* mais le liquide épais exudé est de couleur gris-beige. Le corps de la chenille ne prend pas l'aspect blanc laiteux caractéristique de la polyédrose cytoplasmique.

### b) Caractérisation des pathogènes.

La caractérisation des pathogènes a été faite sur un ensemble de chenilles malades sans différenciation des symptômes, et les différents types de particules virales sont peut-être associés ou non.

Après broyage des chenilles malades récoltées, centrifugation et examen au microscope électronique, de petites particules virales, icosédriques de 35 nm et disposées en chapelet ont été observées (Fig. 4). Il s'agit de virus de type  $\beta$  *Nudaurelia*. En mélange il y a aussi des particules plus petites, très probablement des *Picornavirus* et parfois des *Baculovirus*.

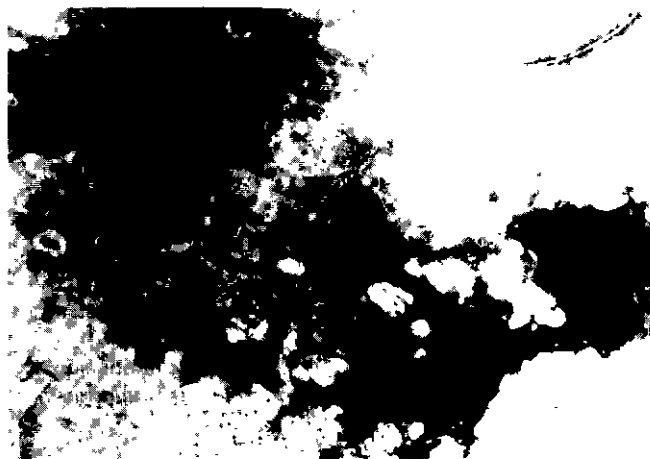


FIG. 4. — Chapelets de particules virales du type  $\beta$  *Nudaurelia* de *Darna trima* Moore (Strings of  $\beta$  *Nudaurelia* type viral particles of *Darna trima* Moore) ( $\times 58.000$ ). Photo : ORSTOM (Côte d'Ivoire).

Il y a ainsi dans les chenilles malades de *Darna trima* trois types de particules virales (INRA, Laboratoire de St-Christol-lez-Alès).

En 1975 Tiong et Munroe ont observé un type de maladie identique au Sarawak, que Tinsley en 1976 avait mentionné comme étant une granulose, et un mélange de petits virus non inclus à ARN. Reinganum *et al.* ont caractérisé ce dernier en 1978 comme un petit virus isométrique de 35 nm de diamètre, de densité de 1 289 g/cm<sup>3</sup> et constitué d'une seule protéine de poids moléculaire de 62 100, donc ayant les caractéristiques physico-chimiques d'un virus de type  $\beta$  *Nudaurelia*.

En 1968, Wood avait décelé une épizootie sur *D. trima* dans la péninsule malaise. Le diagnostic fait par Thomas et

Poinar en 1973 avait permis de mettre en évidence une granulose.

De même une maladie à petits virus, sans doute très voisine, a été mise en évidence par Wikardi en 1984 sur *Darna catenatus* qui s'attaque au cocotier aux Célèbes en Indonésie.

### c) Observations en plantations.

Des épizooties ont été observées au Sud-Sumatra en 1980 comme en Est-Kalimantan en 1986 avec une incidence naturelle de la maladie atteignant 24 p. 100.

### d) Tests expérimentaux.

Sur cette espèce les tests expérimentaux de Tiong et Munroe en 1975 sont bien connus et montrent une réelle efficacité de la solution virale (100 p. 100 de mortalité).

## 3. — Maladie virale de *Birthissea bisura* Moore.

### a) Symptomatologie de la maladie.

Une chenille en début de maladie devient plus jaunâtre, la bande médiane et les taches sont moins bleutées, plus diffuses. Puis, très rapidement, le corps de la chenille devient entièrement rougeâtre. La maladie se développe rapidement et les jeunes chenilles meurent en 4 ou 5 jours.

### b) Caractérisation des pathogènes de *Birthissea bisura* Moore.

Malgré le peu de matériel disponible, la purification et l'isolement du pathogène ont été faits au laboratoire de l'INRA de St-Christophe-les-Alès. Quelques particules virales ont été mises en évidence qui, toutes d'un diamètre de 35 nm, sont du type virus  $\beta$  *Nudaurelia*.

### c) Observations de la maladie en plantation.

Des chenilles malades ont été trouvées dans le Sud-Sumatra mais moins de 1 p. 100 de la population était affecté au moment de l'observation.

## 4. — Recherches de maladies sur *Setora nitens* Walker.

### Recherche de chenilles malades.

En Indonésie, malgré une recherche intensive de chenilles malades aussi bien à Sumatra, Java qu'en Kalimantan sur palmier à huile ou sur cocotier dans des populations endémiques ou en pullulations, aucune maladie virale n'a été trouvée pour cette espèce.

La seule mention d'une maladie a été faite à Sabah [Syed, 1970] dans la région de Kudat. Cette épizootie aurait détruit 60 p. 100 des chenilles. En 1982 Greenwood et Moore ont indiqué la présence de particules de type  $\beta$  *Nudaurelia*.

## 5. — Maladies virales de *Parasa lepida* Cramer, Limacodidae du cocotier.

### a) Symptomatologie de la maladie.

A partir de chenilles de dernier stade infectées artificiellement nous avons pu suivre le développement de la maladie :

- arrêt d'alimentation et immobilité ;
- coloration plus claire, jaunâtre puis aspect laiteux. Ensuite la chenille devient plus sombre. Il se produit des écoulements par les parties anale et buccale.

### b) Caractérisation des pathogènes.

Il apparaît deux sortes de particules virales à l'examen en microscopie électronique (INRA, St Christol-lez-Alès) :

- de petites particules icosaédriques d'environ 35 nm du type  $\beta$  *Nudaurelia* ;
- de gros granules ovoïdes de taille hétérogène avec des virions en bâtonnets d'environ 200 nm de long sur 40 nm de large.

Ainsi, la maladie de *Parasa lepida* résulte d'une double infection d'un *Baculovirus* responsable d'une granulose et d'un petit virus du type  $\beta$  *Nudaurelia*.

### c) Observations en plantation.

Le gréganisme de l'espèce tout au long de son développement permet à des populations entières d'être contaminées sur l'ensemble d'une palme ou d'un palmier. L'incidence naturelle de la maladie en champ sur une population dans les Lampung, Sud-Sumatra, peut être de quelques pour cent à 100 p. 100. Une moyenne de 20 p. 100 est généralement trouvée. Mais la maladie installée, la population de *Parasa* disparaît peu à peu au cours des générations suivantes, toutes les colonies arrivant à être infectées.

### d) Tests expérimentaux.

Les traitements par pulvérisation de colonies sur cocotiers isolés à raison de 1 ml de solution mère pour 100 ml d'eau ont donné les résultats suivants (Fig. 5) :

- pour un stade II, la mortalité est de 78 p. 100 après 3 jours et 100 p. 100 au 6<sup>e</sup> jour. Mais pour un stade VI la mortalité est de 4 p. 100 à 3 jours, 87 p. 100 à 7 jours et 100 p. 100 à 12 jours ;
- dans le cas d'une réinfestation artificielle c'est-à-dire mise en place de chenilles sur une palme où des chenilles sont mortes trois mois auparavant et où il reste des cadavres, une mortalité de 100 p. 100 n'est obtenue pour le stade II qu'à 12 jours seulement ;
- quant au témoin pour un stade de même âge, stade II, la mortalité après 12 jours n'atteint que 18 p. 100.

## III. — PERSPECTIVES

### 1. — Début d'utilisation des virus en plantation.

Un premier essai de traitement à l'aide d'un atomiseur à dos avec une solution virale du Limacodidae *Sibine fusca* a été fait en Colombie (Amérique du Sud) en 1975 en utili-

sant 10 à 20 g de larves broyées et filtrées pour 50 l d'eau ; et une mortalité de 94 à 97 p. 100 a été obtenue avec 2 l de solution par arbre.

Ensuite, des traitements à échelle industrielle à titre d'essais par avion équipé de micronair ont été faits contre *Sibine fusca* sur plusieurs centaines d'hectares. Avec seulement 20 l de solution/ha, une mortalité voisine de 100 p. 100 a été obtenue. Mais ce traitement pour être efficace doit être effectué sur les jeunes stades en début de cycle car la mortalité n'apparaît qu'après 20 jours [Genty, Mariau, 1975].

En 1975 également, en Malaisie au Sarawak, des traitements ont été effectués avec succès contre *Darna trima*. Plusieurs dizaines d'hectares de palmiers à huile de 3 ans avaient été traités à l'aide d'un atomiseur à raison de 50 ml d'inoculum concentré frais de solution virale pour 100 l d'eau, donnant 100 p. 100 de mortalité en une période de 8 à 24 jours [Tiong *et al.*, 1977].

En Afrique de l'Ouest sur *Latoia viridissima* en 1984 sur des palmiers de 4-5 mètres de haut traités à partir du sol à l'aide d'un appareil à pression préalable avec une suspension de *Picornavirus* équivalente à 425, 1 900 et 3 700 g de chenilles malades/ha, la mortalité a été respectivement de 11, 44 et 61 p. 100 une semaine après l'application. Par contre, 15 jours plus tard la mortalité était équivalente sur l'ensemble des parcelles y compris les témoins.

Pour *Casphalia extranea* en 1985 sur blocs de 10 ha, une solution de *Densovirus*, préparée avec 50 ou 100 chenilles malades/ha et appliquée par hélicoptère, donne 5 jours plus tard une mortalité de 72 à 81 p. 100 alors qu'elle n'est que de 28 p. 100 sur le témoin [Fédière *et al.*, 1984, 1986].

### 2. — Possibilités de lutte microbiologique.

Dans toute la zone de culture du palmier à huile et du cocotier des épizooties spectaculaires ont été décelées sur plusieurs Limacodidae, de même que sur quelques autres ravageurs, Hesperidae et Psychidae notamment. Actuellement des virus utilisables, dont les souches sont conservées, ont été mis en évidence sur trois espèces de Limacodidae en Amérique du Sud, mais des maladies ont été observées sur bien d'autres espèces, trois espèces de Limacodidae et une d'Hesperidae en Afrique de l'Ouest, et une dizaine d'espèces de Limacodidae dans le Sud-Est asiatique.

Parmi les pathogènes trouvés, plus de la moitié sont des petits virus, *Densovirus*, *Picornavirus*,  $\beta$  *Nudaurelia*, le

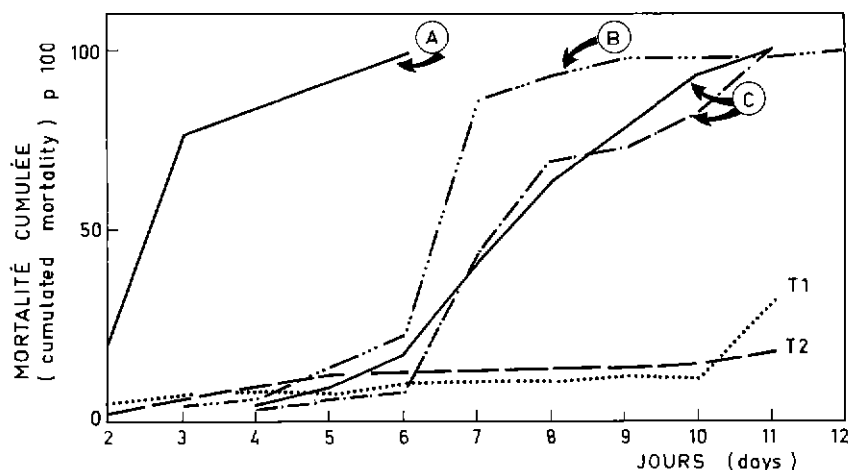


FIG. 5. — Traitement de différents stades de *Parasa lepida* Cramer avec une solution virale — granules et  $\beta$  *Nudaurelia* — (Treatment of different *Parasa lepida* Cramer instars with a viral solution — granulosis and  $\beta$  *Nudaurelia*).

A : Traitement stade II solution virale (Treatment II<sup>nd</sup> instar viral solution).

B : Traitement stade VI solution virale (Treatment VI<sup>th</sup> instar viral solution).

C : Contamination naturelle Stade II — réinfestation (Natural contamination — II<sup>nd</sup> instar — reinfestation).

T1 : 1<sup>er</sup> témoin, Stade II (1<sup>st</sup> control, II<sup>nd</sup> instar), T2 : 2<sup>e</sup> témoin, Stade II (II<sup>nd</sup> control, II<sup>nd</sup> instar).

reste se partage entre *Baculovirus* de polyédrose nucléaire et de granuloze, et *Reovirus* de polyédrose cytoplasmique. Très fréquemment ces virus sont associés chez la même espèce sans que l'on sache alors quel virus est la vraie cause de maladie ou s'il y a effet de synergie.

Il y a un potentiel important présenté par ces diverses catégories de virus et, en conséquence, une large perspective pour une meilleure utilisation de ces germes en protection des palmiers.

L'importance des épizooties observées sur quelques espèces : *Sibine fusca*, *Darna trima*, *Setothosea asigna*, *Latoia viridissima* a donné l'idée de les utiliser en vraie grandeur, en particulier étant donné leur spécificité stricte. Dès les premières applications, des résultats très intéressants ont été ainsi obtenus, ce qui montre bien qu'une lutte micro-biologique est possible.

## CONCLUSION

En Indonésie, les attaques du palmier à huile et du cocotier, par les chenilles, Limacodidae principalement, atteignent plus de 100 000 ha par an, entraînant généralement de fortes pertes de production si des traitements ne sont pas effectués. Les surfaces traitées contre les chenilles phyllophages sont également importantes en Afrique et en Amérique du Sud.

Les insecticides appliqués organophosphorés, pyréthri-noïdes et carbamates sont efficaces mais d'un coût très élevé et leur emploi intensif entraîne souvent l'obligation d'utiliser des doses plus fortes pour remédier à d'éventuelles apparitions de phénomènes de résistance.

En outre, malgré les précautions prises (réseaux d'aver-tissement, limitation des surfaces traitées au minimum) les prédateurs et les parasitoïdes sont peu à peu éliminés car les surfaces à traiter sont trop importantes pour que soient respectées les périodes rigoureuses pendant lesquelles les traitements doivent être faits. Il importe donc de revenir à une situation plus équilibrée en utilisant des facteurs

limitants naturels de ces pullulations de chenilles tels que les virus entomopathogènes. Ces virus présentent un intérêt économique remarquable permettant de réduire le coût des traitements et d'éviter la perturbation du milieu naturel en préservant les auxiliaires.

Par les résultats déjà connus sur les Limacodidae, l'utili-sation des virus comme insecticide biologique s'avère être possible. Malgré des réussites spectaculaires en utilisant des solutions virales de type artisanal, de tels traitements n'ont pas été continués car il s'agit de surmonter les contraintes de spécificité, de production, des méthodes d'application et d'évaluer l'inocuité des préparations virales vis-à-vis des vertébrés.

C'est le but du programme d'études que viennent d'entreprendre l'IRHO, l'OSTOM et l'INRA pour :

- prospecter les maladies virales et d'identifier le maté-riel ;
- acquérir une meilleure connaissance de ces virus et de la biologie de leurs hôtes ;
- sélectionner des souches sur leur pouvoir pathogène ;
- estimer les potentialités d'utilisation, de spécificité ou de polyspécificité avec analyse des gammes d'hôtes ;
- tester expérimentalement sur le terrain et en labora-toire la rapidité d'infestation, la rémanence du pouvoir pathogène, la dispersion des germes, la résistance aux agents extérieurs et les modes de traitement ;
- tester la pathogénicité sur vertébrés.

Les virus des lépidoptères défoliateurs du palmier à huile présentent des potentialités intéressantes pour une large utilisation mais les traitements à l'échelle industrielle devront, dans certains cas, passer par une unité de produc-tion à partir d'un insecte hôte ou sur cellules d'insectes en cultures. Dans d'autres cas, par contre, une production artisanale à l'échelle de la plantation pourra être réalisée.

Cette biotechnologie pourrait fournir aux planteurs une alternance aux pesticides, tout en évitant les défoliations et les pertes de production sans risque de provoquer de désé-quilibre dans les biocénoses.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] AMARGIER A., VAGO C., DUTHOIT J. L., MEYNADIER G. (1979). — Formation tumorale d'origine parvovirale chez *Sibine fusca* Stoll (Lep. Limacodidae). *Entomophaga*, 24 (3), p. 259-271.
- [2] COCK M. J. W. and GODFRAY H. C. J. (1985). — Report on program for the biological control of selected coconut pest in the Philippines CIBC, Imperial College. UK. 75 p.
- [3] DE JONG A. W. K. (1925). — Verslag van den directeur van het algemeen Proefstation der A.V.R.O.S., 1 Juli 1924 — 30 Juni 1925 — Meded. Algem. Proefst. A.V.R.O.S. Algem., Ser. 22, p. 1-30.
- [4] DESMIER de CHENON R. (1982). — *Latoia (Parasa) lepida* (Cramer) Lepidoptera Limacodidae, ravageur du cocotier en Indonésie (bilingue fr.-angl.). *Oléagineux*, 37, n° 4, p. 177-183.
- [5] FÉDIÈRE G., DESMIER de CHENON R., MARIAU D. et MON-SARRAT P. (1981). — Mise en évidence de maladies à épizootie de type denonucleose chez deux chenilles de Limacodidae, lépi-doptères phyllophages du palmier à huile et du cocotier en Côte d'Ivoire. *Abstr. Colloq. Intern. Protec. Cult. Trop.*, Lyon, France.
- [6] FÉDIÈRE G. (1983). — Recherches sur les viroses épizootiques de lépidoptères Limacodidae, ravageurs des palmacées. *Thèse USTL Montpellier*, 103 p.
- [7] FÉDIÈRE G., MONSARRAT P. and PHILIPPE R. (1984). — Biological control of a limacodid oil palm pest in Ivory Coast, by use of a small isometric virus. *First Regional Symposium on Biologi-cal control* 3-5 September 84, Serdang, Malaysia, 5 p.
- [8] FÉDIÈRE G., MONSARRAT P. and MARIAU D. (1986). — Biological control of *Casphalia extranea* (Lepidoptera Limacodi-dae) defoliation of oil palm and coconut in Ivory Coast by a new *Densovirus*. *MAPS 2nd Inter. Conference*, 17-20 March 1986, Ser-dang, Malaysia, 2 p.
- [9] GENTY P., MARIAU D. (1975). — Utilisation d'un germe ento-mopathogène dans la lutte contre *Sibine fusca* Stoll (Limacodidae) (bilingue fr.-angl.). *Oléagineux*, 30, n° 8-9, p. 349-354.
- [10] GENTY P., DESMIER de CHENON R., MORIN J. P., KORY-TKOWSKI C. A. (1978). — Les ravageurs du palmier à huile en Amérique latine (N° spécial trilingue). *Oléagineux*, 33, n° 7, p. 325-419.
- [11] GINTING ULIN C. and DESMIER de CHENON R. (1986). — Harapan baru pengendalian hayati *Parasa lepida* Cramer, Limaco-didae dengan Pemanfaatan virus (New biological perspectives to control a major coconut pest in Indonesia : *Parasa lepida* Cramer, Limacodidae by the use of viruses). *Temu Ilmiah Entomologi Per-kebunan Indonesia*, 1986, 22-24 April, Medan 26 pp.
- [12] GREENWOOD L. K. and MOORE N. F. (1982). — The Nudau-relia  $\beta$  group of small RNA containing viruses of insects : Serolo-gical identification of several new isolates. *Jour. Invertebr. Pathol.*, 39, p. 407-409.
- [13] MARTIGNONI M. E. and IWAI P. J. (1981). — A catalogue of viral diseases of insects, mites and ticks. In : *Microbial control of pest and plant diseases, 1970-1980*. Acad. Press, London, p. 897-911 (H. D. Burges ed.).
- [14] MEYNADIER G., AMARGIER A. et GENTY P. (1977). — Une virose de type denonucleose chez le lepidoptere *Sibine fusca* Stoll (bilingue fr.-angl.). *Oléagineux*, 32, n° 8-9, p. 357-361.
- [15] PURBA ROLETTHA Y., SIPAYUNG A. and DESMIER de CHENON R. (1986). — Kemungkinan Pengendalian Serangga hama pada tanaman kelapa sawit secara hayati (Biological control

- possibilities of insect pests on oil palm) *Temu Ilmiah Entomologi Perkebunan, Indonesia*, 1986, 22-24 April Medan, 11 pp.
- [16] REINGANUM C., ROBERTSON J. S. and TINSLEY T. W. (1978). — A new group of RNA viruses from insects. *Journ. Gen. Virol.*, **40**, p. 195-202.
- [17] SIPAYUNG A. and DESMIER de CHENON R. (1986). — Survei/inventarisasi hama dan musuh alamiahnya pada perkebunan kelapa sawit di Kalimantan Barat dan timur (Survey/Inventory of oil palm insect pests and their natural enemies in West and East Kalimantan). *Temu Ilmiah Entomologi Perkebunan, Indonesia*, 1986, 22-24 April, Medan, 13 pp.
- [18] SMITH K. M. and XEROS N. (1984). — A comparative study of different types of viruses and their capsules with polyhedroses and granuloses of insect. *Parasitology*, **44**, p. 400-406.
- [19] SYED R. A. (1970). — Biological control possibilities of some insect and weed pests in Sabah. *Malaysian Crop. Protection Conf.*, Kuala Lumpur, 1970, p. 124-132.
- [20] TAMS W. H. T. (1930). — Four moths of the family Limacodidae injurious to coconut palms. *Bull. Ent. Res.*, **21** (4), p. 489-490.
- [21] THOMAS G. M. and POINAR G. O. Jr (1973). — Report of diagnoses of diseased insects 1962-1972. *Hilgardia*, **42**, p. 261-360.
- [22] TIONG R. H. C. and MUNROE D. D. (1977). — Microbial control of an outbreak of *Darna trima* (Moore) on oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in Sarawak (Malaysian Borneo). *International Developments in Oil Palm, Kuala Lumpur*, p. 624-639, Inc. Soc. Planters.
- [23] TIONG R. H. C. (1978). — Use of virus to control *Darna trima* (Moore) in oil palm plantations. *Proc. Plant Protection Conf.*, 22-25 March 1973, p. 141-147.
- [24] TIONG R. H. C. (1979). — Some predators and parasites of *Mahasena corbetti* (Tams) and *Thoesa asigna* (Moore) in Sarawak. *Planter*, Kuala Lumpur, **55**, p. 279-289.
- [25] TIONG R. H. C. (1982). — Study of some aspects of biology and control of *Thoesa asigna* (Moore). *Proc. International Conf. Oil Palm*, Kuala Lumpur, 17-20 June 1981, p. 529-542.
- [26] VAGO C., MEYNADIER G. and DUTHOIT J. L. (1964). — Etude d'un nouveau type de maladie à virus chez les lepidoptères. *Ann. Epiphyties*, **15**, 4, p. 475-479.
- [27] WOOD B. J. (1968). — Pests of oil palm in Malaysia and their control. Kuala Lumpur, Inc. Soc. Planters, 204 pp.
- [28] WOOD B. J. (1976). — Insect Pests in South East Asia. Oil Palm Research, Elsevier Publ., p. 347-367.

## SUMMARY

### Research into entomopathogenic agents of viral origin in leaf-eating Lepidoptera of the oil palm and coconut.

R. DESMIER de CHENON, D. MARIAU, P. MONSARRAT, G. FEDIÈRE and A. SIPAYUNG, *Oléagineux*, 1988, **43**, N° 3, p. 107-117.

Initial determinations of entomopathogenic organisms of viral origin and the first trials on *Limacodidae* in plantations were carried out as early as 1975 at the instigation of the IRHO. Small free viruses — *Densoviruses*, *Picornaviruses* — were detected in South America and West Africa and others, but of the  $\beta$  *Nudaurelia* type, in Southeast Asia. Larger viral particles *Reoviruses* (cytoplasmic polyhedrosis), *Baculoviruses* (nuclear polyhedrosis, granulosis) were also observed. In Indonesia, research was undertaken into viral diseases and the symptomology of new diseases was analyzed: cytoplasmic polyhedrosis and diseases caused by small viruses on *Setothosea asigna*, association of granulosis and small viruses of the  $\beta$  *Nudaurelia* type on *Darna trima*, *Parasa lepida*. In addition to characterizing these pathogens, observations on the incidence of these diseases and the first experimental tests were also carried out on plantations. The initial results obtained, when applied on a true scale, show that microbiological control is possible. Studies of these viral diseases, prospection, identification of viruses, selection of strains, determination of potential for use, experimental tests and pathogenicity tests, in the laboratory and in the field, are still necessary on secondary hosts or invertebrate cells before production units are set up. This biotechnology should provide an alternative to chemical insecticides, thereby reducing the risks of disrupting environmental balance.

## RESUMEN

### Investigaciones sobre los organismos entomopatógenos de origen virótico en los lepidópteros defoliadores de la palma africana y del cocotero.

R. DESMIER de CHENON, D. MARIAU, P. MONSARRAT, G. FEDIÈRE y A. SIPAYUNG, *Oléagineux*, 1988, **43**, N° 3, p. 107-117.

Las primeras determinaciones de organismos entomopatógenos de origen virótico y los primeros experimentos en las plantaciones sobre *Limacodidae* se hicieron a instigación del IRHO a partir del año 1975. Unos pequeños virus libres *Densovirus* y *Picornavirus*, se evidenciaron en América del Sur y en el África occidental, y otros de tipo  $\beta$  *Nudaurelia* se evidenciaron en el Sudeste asiático. Asimismo se observaron partículas de virus de mayor tamaño, *Reovirus* (poliedrosis citoplasmática), *Baculovirus* (poliedrosis nuclear, granulosis). En Indonesia se hizo una investigación sobre enfermedades por virus, y se analizó la sintomatología de nuevas enfermedades, como poliedrosis citoplasmática y enfermedad de pequeños virus sobre *Setothosea asigna*, una asociación de granulosis y de pequeños virus de tipo  $\beta$  *Nudaurelia* sobre *Darna trima*, *Parasa lepida*. Además de caracterizar a estos patógenos, se hizo observaciones de la incidencia de estas enfermedades, y también las primeras pruebas experimentales en plantaciones. Los primeros resultados de utilización en las condiciones de una plantación muestran que es posible llevar a cabo una lucha microbiológica. Antes de pasar a la aplicación de esta lucha a las unidades de producción, aún se necesita estudiar estados de estas enfermedades viróticas, hacer prospecciones, estudiar la identidad de los virus, seleccionar cepas, conocer las potencialidades de utilización, hacer pruebas experimentales, pruebas de carácter patógeno en laboratorio y en el campo sobre hospederos secundarios o células de invertebrados. Esta biotecnología debería ofrecer una alternativa a los insecticidas químicos, disminuyendo el riesgo de provocar desequilibrios en las biocenosis.



# Research into entomopathogenic agents of viral origin

## in leaf-eating Lepidoptera of the oil palm and coconut <sup>(1)</sup>

R. DESMIER de CHENON (2), D. MARIAU (3), P. MONSARRAT (4), G. FÉDIÈRE (5) and A. SIPAYUNG (6)

### INTRODUCTION

Natural epizootic diseases affecting oil palm leaf-eating caterpillars have long been known to exist. During a *Darna trima* Moore attack on oil palm in North Sumatra (Indonesia), De Jong [1925] recorded the occurrence of a disease which naturally eliminated the outbreak of this species over an area of 300 hectares. A disease assumed to be the same one and of viral origin was also found in Sabah, Malaysia [Young, 1971].

As regards coconut, Tams [1930] mentions a disease said to be of bacterial origin in *Darna catenatus* (Snellen) which destroyed 80 p. 100 of the caterpillar population in North Sulawesi. In this caterpillar species, which is endemic to Sulawesi, this same disease recently recurred, and a very small virus was isolated [Wikardi, 1984].

Over the last ten years or so, a start has been made in identifying the pathogens which cause these diseases through electron microscopy and other laboratory techniques; this has led to considering the possible use of such micro-organisms as a means of microbiological pest control.

The first Limacodidae virus identification operations and the first plantation tests were conducted on the initiative of the IRHO (7) in South America [Genty, Mariau, 1975]. This paper is particularly concerned with results obtained on Limacodidae in Indonesia.

### I. — CHRONOLOGICAL ACCOUNT OF INITIAL IDENTIFICATION AND CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

Vago [1964], from the INRA (7), discovered densovirus whose agents (densoviruses) were then detected in *Sibine fusca* Stoll, a South American oil palm Limacodidae [Meynadier *et al.*, 1977]. Recently, another *Densovirus* was found in *Casphalia extranea* Wlk, a West African oil palm and coconut pest [Fédière *et al.*, 1981]. In 1977, viral diseases were also identified in Southeast Asia in *Darna trima* Moore and *Setothosea asigna* van Eecke [Tiong *et al.*, 1977, 1979] with the presence of a  $\beta$  *Nudaurelia* type virus [Reinganum *et al.*, 1978].

Other *Picornavirus* type viruses were detected in *Latoia viridissima* Holland in Côte d'Ivoire [Fédière *et al.*, 1981; Fédière, 1983]. Viruses of the *Baculovirus* type (viruses of nuclear polyhedrosis and granulosis), which are easier to identify because they give rise to inclusion bodies, have been observed in various other species, mostly in Limacodidae such as *Darna nararia* Moore in Sri Lanka [Smith *et al.*, 1954], *Darna trima* Moore in Malaysia [Thomas *et al.*, 1973] and *Natada pucara* Dognin in Colombia, South America [Genty *et al.*, 1978].

Since 1981, numerous diseases in other species and many different diseases in the species mentioned above have been observed in countries where the IRHO is present. These diseases have been characterized by the INRA and ORSTOM (7) and the results are given in table 1.

Diseases have also been found in species such as *Hiradi irava* Moore Hesperidae in Indonesia, *Zophopetes cerymica* Hewitson (another species of the same family in Côte d'Ivoire), and *Natada mihorta* Dyar a few months ago in Brazil.

### II. — MANIFESTATION OF VIRAL DISEASES IN LIMACODIDAE IN INDONESIA

Most leaf-eating caterpillars attacking strongly palm trees in Indonesia, particularly oil palm, are Limacodidae. Damage is caused by five dominant species: *Setothosea asigna* van Eecke, *Birthissea bisura* Moore, *Darna trima* Moore, *Setora nitens* Walker and *Parasa lepida* Cramer on coconut.

#### 1. — Viral diseases in *Setothosea asigna* van Eecke.

##### a) Disease symptomatology.

##### — « Milky » disease.

One of the characteristics of caterpillars infected with this disease is a milky discharge.

Symptoms become evident through changes in behaviour: first the caterpillar stops moving and feeding and integuments become less shiny and whitish. An exudate sometimes occurs. The integuments then tear, discharging a thick brownish liquid with milky threads. Long milky white traces remain on the leaf. Inside the caterpillar, the organs are completely disorganized, and the alimentary canal is hypertrophied and whitish.

##### — « Deliquescent » disease.

Caterpillars can also be affected by a completely different series of symptoms, which are generally observed in early stages of development. The following symptoms are those of an infected 6th instar caterpillar.

##### External symptoms :

The caterpillar stops feeding and remains motionless. The body turns yellow around the ventral section and around the dorsal patches, with lateral reddish-brown colouration and more or less transparent sides revealing total deliquescence of internal tissues. The caterpillar skin breaks open easily, releasing a yellowish liquid.

##### Internal symptoms :

These symptoms were observed when healthy and infected 6th instar caterpillars were dissected shortly after the disease occurred.

• Diseased caterpillar: Abundant yellowish hemolymph. Digestive system empty. No abundant fatty tissue. Deliquescent intestine, nauseating odour with proliferation of bacteria if disease is in advanced stage.

• Healthy caterpillar: Clear hemolymph. Dark brown alimentary canal filled with plant matter. Large masses of fatty tissue.

##### b) Identification of pathogens.

Two sets of symptoms, and thus two diseases, occur in infected *S. asigna* caterpillars, which confirms the electron microscope analysis.

##### — Caterpillars infected with « milky » disease.

*S. asigna* caterpillars at the end of their development (instars 7-9) with the characteristic symptoms of milky disease were examined by the INRA (St-Christol-lez-Alès Station).

(1) Communication presented at « 1987 International oil palm/palm oil Conferences, Progress and prospects », 23-26 June 1987, Kuala Lumpur (Malaysia).

(2) IRHO Consultant in Indonesia; c/o IRHO-CIRAD; 11, Square Pétrarque, 75116 Paris (France).

(3) Director of the IRHO-CIRAD Entomology Division. B. P. 5035, 34032 Montpellier Cedex (France).

(4) ORSTOM, 213, rue Lafayette, 75480 Paris Cedex (France).

(5) ORSTOM Centre d'Adiopodoumé, B. P. 51, Abidjan 01 (Côte d'Ivoire).

(6) P. P. Marhat, P. O. Box 37, Pematang Siantar, North Sumatra (Indonesia).

(7) IRHO: Institut de Recherches pour les Huiles et Oléagineux.

INRA: Institut National de la Recherche Agronomique.

ORSTOM: Institut Français de Recherches Scientifiques pour le Développement en Coopération.

Electron microscopy revealed the presence of polyhedral inclusion bodies. After clarification, the inclusion bodies were found to contain spherical viral particles of 60-70 nm embedded in cavities (Fig. 1). These are *Reoviruses* characteristic of reovirus or cytoplasmic polyhedrosis. These polyhedral inclusion bodies develop in the cells of the mid-gut.

— *Caterpillars infected with « deliquescent » disease.*

The caterpillars were analyzed at the ORSTOM Entomovirology Laboratory in Côte d'Ivoire.

Small icosahedral viral particles of 35 nm in diameter of the  $\beta$  *Nudaurelia* type were found (Fig. 2). This virus (diam. 35 nm, density 1,275 g/cm<sup>3</sup>, capsid protein with a molecular weight of 60,800) had already been identified by Reinganum *et al.* [1978] in infected *S. asigna* caterpillars collected by Tiong during an outbreak of this species in Sarawak (1976-77).

c) *Plantation observations.*

The two viral diseases of *S. asigna*, cytoplasmic polyhedrosis and  $\beta$  *Nudaurelia* type virosis, can be found on the same plantation separately or together.

In 1980-81 (Aek Loba Estate, SOCFINDO), a cytoplasmic polyhedrosis, although not frequent, was found together with caterpillars showing symptoms of the  $\beta$  *Nudaurelia* type disease, though it is not possible to say whether the two diseases were associated. However, the cytoplasmic polyhedrosis tended to be the dominant disease in *S. asigna* caterpillar populations of the last instars on *E. guineensis*  $\times$  *E. oleifera* hybrids, whereas this disease was almost nonexistent on *E. guineensis*.

On the other hand, the same cytoplasmic polyhedrosis discovered in 1985 in North Sumatra (Marihat Station), was not found together with any other disease.

This cytoplasmic polyhedrosis was enough to wipe out a residual population of *S. asigna* caterpillars at Marihat, as well as a population found on hybrids at Aek Loba. Nonetheless, on blocks with very severe caterpillar outbreaks, this disease does not seem to have a very marked natural impact. On the other hand, the second disease with very small viruses seems far more virulent, particularly on young stages. Entire colonies or the total population, with 150 to 200 caterpillars per frond, can be destroyed naturally, with the dead larvae sticking to the underside of the leaflets. Without experiments, however, it is difficult to gauge the impact of this type of action.

d) *Initial experiments.*

— *Cytoplasmic polyhedrosis.*

Using the unprocessed body fluids of infected caterpillars, which may have contained small quantities of another virus, known *S. asigna* populations of the 3rd to 5th instar found on young crops were treated using manual sprayers with a 4 p. 100 mixture of master solution containing 50 g of dead caterpillars in 250 ml of water.

After 8 days, mortality observed in three replications (200 caterpillars per replication) was 84 p. 100, 88 p. 100 and 89 p. 100, whereas in a control group, mortality was 23 p. 100, or at most, 41 p. 100 (Fig. 3). After 15 days, cumulative mortality in the treated plots reached 95-100 p. 100.

—  *$\beta$  Nudaurelia virosis.*

In 1980-81, *S. asigna* caterpillars with symptoms of this disease were collected, blended and passed through a coarse filter. The viral solution obtained was immediately used to spray 40 hectares of highly infested young crops which had just started to bear. The results were spectacular: the caterpillar population was totally eradicated within 10 days. On the other hand, treatments using dead caterpillars collected afterwards gave less satisfactory results. It should, however, be noted that the master solution was stored under very poor conditions for several months.

These results may be compared with those recorded by Tiong [1981] who speaks of « erratic » results after the use of a viral solution based on infected *S. asigna* caterpillars whose pathogenic agent was also a  $\beta$  *Nudaurelia* type virus. This virus is effective, but it seems that its pathogenic capacity is greatly affected by storage conditions.

Our information indicates that the  $\beta$  *Nudaurelia* virus disease is far more widely distributed than cytoplasmic polyhedrosis. Now that the symptoms are known and the viral particles identified, studies currently in progress at Marihat should make it possible to assess the potential of these pathogens either individually or in association, using purified material.

## 2. — Viral diseases in *Darna trima* Moore caterpillars.

a) *Disease symptomatology.*

During the various phases of the disease, external symptoms are similar to those of the « milky » disease in *S. asigna*, but the exuded thick liquid is greyish beige in colour. Moreover, the body of the caterpillar does not take on the milky white appearance characteristic of cytoplasmic polyhedrosis.

b) *Identification of pathogens.*

The pathogens were identified using a batch of infected caterpillars whose symptoms had not been categorized; the various types of viral particles observed may or may not be associated.

After the infected caterpillars collected had been blended, centrifuged and examined under an electron microscope, a string of small 35 nm icosahedral particles was observed (Fig. 4). Whilst these were  $\beta$  *Nudaurelia* type viruses, smaller particles, most probably Picornaviruses and some Baculoviruses, were also found.

The infected *Darna trima* caterpillars thus contained three types of viral particles (INRA, St Christol-les-Alès Laboratory).

Tiong and Munroe [1975] observed an identical type of disease in Sarawak, which Tinsley [1976] reported as a granulosis and a mixture of small RNA non-occluded viruses. Reinganum *et al.* [1978] identified the latter in 1978 as a small isometric virus (dia. 35 nm, density 1,289 g/cm<sup>3</sup>, made up of a single protein with a molecular weight of 62,100) whose physicochemical characteristics were thus those of a  $\beta$  *Nudaurelia* type virus.

Wood [1968] recorded an epizootic in *D. trima* on the Malay peninsula. The diagnosis made by Thomas and Poinar [1973] was that this was a granulosis.

Likewise, a disease with a small non-occluded virus which appears to be very similar was detected by Wikardi [1984] in *Darna catenatus* which attacks coconut in Sulawesi, Indonesia.

c) *Plantation observations.*

Epizootic diseases were observed in South Sumatra in 1980 and East Kalimantan in 1986 with a natural incidence of up to 24 p. 100.

d) *Experiments.*

Experiments carried out on this species by Tiong and Munroe [1975] are well known and their results show that the viral solution is very effective (mortality: 100 p. 100).

## 3. — Viral disease in *Birthissea bisura* Moore.

a) *Disease symptomatology.*

Initially, the caterpillar turns increasingly yellowish, whilst the median stripe and patches become less bluish and more diffuse. Very quickly the whole body of the caterpillar turns reddish. The disease develops rapidly and the young caterpillars die within 4-5 days.

b) *Identification of *Birthissea bisura* Moore pathogens.*

Despite the limited material available, the pathogen was purified and isolated (INRA, laboratory, St-Christol-les-Alès). Some viral particles were found, all with a diameter of 35 nm and of the  $\beta$  *Nudaurelia* virus type.

c) *Disease observations on plantations.*

Infected caterpillars were found in South Sumatra, but less than 1 p. 100 of the population was affected on the day of observation.

## 4. — Research into diseases in *Setora nitens* Walker.

*Search for infected caterpillars.*

Despite intensive efforts to find infected caterpillars on oil palms or coconuts in Sumatra, Java and Kalimantan, from either endemic populations or infestations, no viral disease was found for this species.

The only record of a disease was in Sabah [Syed, 1970] in the Kudat region. This epizootic apparently destroyed 60 p. 100 of the caterpillars. Greenwood and Moore [1982] indicated the presence of  $\beta$  *Nudaurelia* particles.

## 5. — Viral diseases in *Parasa lepida* Cramer (Limacodidae which attack coconuts).

### a) Disease symptomatology.

It was possible to follow the development of the disease by using artificially infected caterpillars in the final instar of their development :

- they stopped feeding and stopped moving ;
- they became lighter in colour and yellowish, then took on a milky appearance. The caterpillars then turned darker, with anal and buccal discharges.

### b) Identification of pathogens.

Two sorts of viral particles were detected using an electron microscope (INRA, St-Christol-lez-Alès) :

- small icosahedral particles of about 35 nm of  $\beta$  *Nudaurelia* type ;
- large ovoid granules of heterogeneous size with rod-like virions about 200 nm long  $\times$  40 nm wide.

The disease affecting *Parasa lepida* thus results from a double infection by a Baculovirus which causes granulosis and a small virus of the  $\beta$  *Nudaurelia* type.

### c) Observations on plantations.

The gregariousness of the species throughout its development means that entire populations can be contaminated over the whole of a frond or palm tree. Natural incidence of the disease in the field on a population in Lampung in South Sumatra can vary from a few per cent to 100 p. 100. An average value of 20 p. 100 per batch was generally found. However, once the disease has set in, the *Parasa* population gradually disappears with subsequent generations as all the colonies become infected.

### d) Experiments.

Spraying colonies on isolated coconuts using 1 ml of master solution to 100 ml of water gave the following results (Fig. 5).

- For instar II, mortality is 78 p. 100 after 3 days and 100 p. 100 by the 6th day. In the case of instar VI, mortality is 4 p. 100 by day 3, 87 p. 100 by day 7, and 100 p. 100 at 12 days.

— In the case of artificial reinfestation, i.e. placing larvae on a palm where larvae died 3 months before and where dead bodies remain, 100 p. 100 mortality was obtained for instar II only at 12 days.

- For the control larvae at instar II, mortality after 12 days was only 18 p. 100.

## III. — PROSPECTS

### 1. — Initial use of viruses on the population.

The first trial using a Limacodidae (*Sibine fusca*) viral solution in mistblowers was carried out in 1975 on a few trees in Colombia (South America) with 10-20 g of blended filtered larvae to 50 l water ; a mortality of 94-97 p. 100 was obtained using 2 l of solution per tree.

Full-scale industrial treatment against *Sibine fusca* was then carried out over an area of several hundred hectares using an aircraft equipped with a Micronair system. With only 20 l of solution/ha, almost 100 p. 100 mortality was obtained. However, if this treatment is to be effective, it must be carried out during the early stages of caterpillar development, as mortality does not occur until day 20 [Genty, Mariau, 1975].

Treatments against *Darna trima* were also successful in 1975 in Sarawak (Malaysia). Several dozen hectares of 3-year old oil palms were sprayed using 50 ml of fresh concentrated viral solution inoculum to 100 l of water, resulting in 100 p. 100 mortality over a period of 8-24 days [Tiong *et al.*, 1977].

In 1984 in West Africa, *Latona viridissima* found on 4-5 metre high oil palms were treated from the ground using a mistblower with a Picornavirus suspension equivalent to 425, 1,900 and 3,700 g of diseased caterpillars per hectare. One week after application, mortality was 11, 44 and 61 p. 100 respectively. A fortnight later, however, mortality was the same on all the plots, including the control plots.

In 1985, *Casphalia extranea* 10-hectare blocks were treated by helicopter with a Densovirus solution prepared with 50 or 100 dead caterpillars per hectare. This treatment gave a mortality of 72 and 81 p. 100 5 days later, whereas it was only 28 p. 100 on the control [Fédière *et al.*, 1984, 1986].

### 2. — Microbiological pest control possibilities.

Throughout the oil palm and coconut growing zone, spectacular epizootics have been detected in several Limacodidae and in several other pests, in particular Hesperidae and Psychidae. At present useful viruses whose strains have been conserved have been discovered for three species of Limacodidae in South America, but diseases have been observed in numerous other species (three species of Limacodidae and one species of Hesperidae in West Africa, and about ten species of Limacodidae in Southeast Asia).

Over half the pathogens found are small viruses (*Densovirus*, *Picornavirus*,  $\beta$  *Nudaurelia*), the rest being divided between nuclear polyhedrosis and granulosis *Baculovirus* and cytoplasmic polyhedrosis *Reovirus*. Very frequently these viruses are associated in the same species, which makes it impossible to know which virus is the real cause of the disease and whether synergism occurs.

The various categories of virus thus constitute a significant potential, and offer wide prospects for the more effective use of such germs to protect palm trees.

The amplitude of the epizootic diseases observed in some species (*Sibine fusca*, *Darna trima*, *Setothosea asigna*, *Latona viridissima*) led to the idea of using them on a large scale basis, particularly in view of the strict specificity of each species. From the first applications, the results obtained were very good, which clearly shows that this type of microbiological pest control is possible.

## CONCLUSION

In Indonesia, attacks on the oil palm and coconut, mainly by Limacodidae caterpillars, affect more than 100,000 ha per year, which generally leads to severe losses in yields if no treatment is given. The surface areas treated against phyllophagous caterpillars are also extensive in Africa and South America.

The organophosphate, pyrethroid and carbamate insecticides currently applied are effective but very expensive, and their intensive use often leads to a need for higher rates to overcome resistance phenomena.

Moreover, despite the precautions taken (warning networks, limiting to a minimum the surface areas treated), predators and parasitoids are gradually eliminated, since the surface areas to be treated are so great that the strict periods assigned for treatment are not complied with. It is therefore important to return to a more balanced situation by using natural factors, such as entomopathogenic viruses, to limit caterpillar outbreaks. These viruses offer outstanding economic advantages, as they cut treatment costs and reduce disruption to the environment by preserving natural enemies.

Judging from already known results concerning Limacodidae, the use of viruses as a biological insecticide is possible. Despite spectacular results achieved with viral solutions prepared using rudimentary methods, treatments of this type have not been continued because of constraints linked to specificity, production, and application methods, and because the harmlessness of viral preparations on vertebrates needs to be assessed.

This is the purpose of the study programme which the IRHO and ORSTOM and INRA are beginning to develop with projects to :

- collect viral diseases, and identify the pathogenic material ;
- obtain a fuller understanding of the viruses and the biology of their hosts ;
- select strains on the basis of their pathogenic capacity ;
- estimate potential use and specificity, and analyze ranges of hosts ;
- carry out experimental applications in the field and in the laboratory to test infestation rate, remanence of pathogenic capacity, germ dispersion, resistance to external agents and treatment methods ;
- test pathogenicity with regard to vertebrates.

The widespread use of viruses found in oil palm leaf-eating caterpillars has considerable potential, but industrial-scale production will, in some cases, involve the creation of a production unit using a host insect or cultured cells of insects. In other cases however, unsophisticated plantation-scale production could be set up.

This biotechnology could provide growers with an alternative to chemical pesticides, preventing defoliation and yield losses without the danger of causing environmental imbalance. □